

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

15.4.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

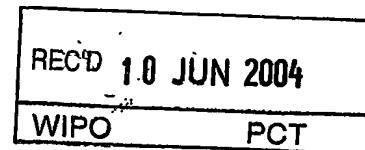
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 4月 25日

出願番号  
Application Number: 特願 2003-121955

[ST. 10/C]: [JP 2003-121955]

出願人  
Applicant(s): 蟻名 洋介  
小畠 利之  
株式会社医学生物学研究所



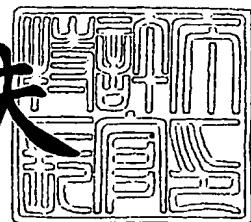
BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月 28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 M3-A0301  
【提出日】 平成15年 4月25日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/74  
【発明者】  
【住所又は居所】 徳島県徳島市八万町上福万3-48  
【氏名】 蟻名 洋介  
【発明者】  
【住所又は居所】 徳島県徳島市新浜町2丁目3-75-101  
【氏名】 小畠 利之  
【発明者】  
【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所内  
【氏名】 岡本 英治  
【特許出願人】  
【識別番号】 594101857  
【氏名又は名称】 蟻名 洋介  
【特許出願人】  
【住所又は居所】 徳島県徳島市新浜町2丁目3-75-101  
【氏名又は名称】 小畠 利之  
【特許出願人】  
【識別番号】 390004097  
【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の工程を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法。

(1) 血液試料をインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体と接触させる工程、

(2) 前記抗体と血液中に存在するインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの結合を検出する工程、および

(3) 両者の結合のレベルに基づいて血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの量を決定する工程

【請求項2】 前記インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体が固相に結合しているか、または固相に結合可能な標識を有する第1の抗体であり、第1の抗体に結合したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットをインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する第2の抗体の結合によって検出する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

インスリンは、生体のエネルギー源であるグルコースの代謝調節において重要な役割を果たしているホルモンである。胰島 $\beta$ 細胞で産生されたインスリンは、インスリンレセプターを有する細胞に作用し、細胞によるグルコースの取り込みを促す。インスリンの作用によって、生体の血糖値は適切な範囲

に維持されている。糖尿病は、なんらかの原因によってインスリンの作用が不十分になった結果としてもたらされる病態の1つである。

#### 【0003】

インスリンの作用が不十分になる主な原因として、インスリンの分泌機能の異常と、インスリンに対する感受性の低下があげられる。前者は1型糖尿病(Type 1 Diabetes Mellitus)と呼ばれる。1型糖尿病においては、インスリンに対する応答性は維持されているため、インスリンの投与によって血糖値のコントロールが可能である。1型糖尿病はインスリン依存性の糖尿病(Insulin Dependent Diabetes Mellitus; IDDM)とも呼ばれ、若年性の糖尿病の主な原因となっている。

#### 【0004】

一方、後者は、2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus)と呼ばれている。2型糖尿病は、インスリン非依存性糖尿病(Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM)とも呼ばれ、成人に多いタイプの糖尿病である。日本では糖尿病患者の95%が2型糖尿病であると言われている。2型糖尿病患者は、生体のインスリンに対する応答性が低下しているため、インスリンを投与しても血糖値をコントロールすることができない。2型糖尿病は幾つかの遺伝子異常と、肥満、ストレス、加齢などの環境因子が加わって発症すると考えられている。現在、日本にも約700万人の2型糖尿病患者がいると言われており、その数は高齢化とともに増加している。糖尿病予備軍も含めると1400万人もの患者がいるという予測もある。したがって、2型糖尿病の診断や治療は、現代社会の重要な研究課題である。

#### 【0005】

現在までのところ、2型糖尿病の原因遺伝子は明らかになっていない。インスリン作用機構に関する因子の遺伝子、またはインスリン分泌に関する因子の遺伝子が候補遺伝子と予想されている。このうち、インスリン作用に関する因子としては、次のような因子が考えられている。

インスリンレセプター、

インスリンレセプターサブストレートー1 (IRS-1)、

グルコーストランスポータータイプ4など

またインスリン分泌に関与する因子の遺伝子として、次のような因子の関与が予想されている。

グルコーストランスポータータイプ2、

グルコキナーゼ、

ミトコンドリア遺伝子など

#### 【0006】

さて、インスリンが標的細胞に作用するには、その細胞膜上に存在するインスリンレセプターと結合することが必須である。また2型糖尿病の初期には、インスリン抵抗性が存在するという多くの報告がある(文献1/Taylor, S. I. Diabetes 41:1473-1490, 1992)。これらのことから、インスリンレセプターの異常と糖尿病の関係についても検討されてきた。インスリンレセプターの機能に異常が存在すると、高度のインスリン抵抗性を示し、重篤な糖尿病となるはずである。

#### 【0007】

一方、最近になって本発明者を含む研究者によって多くのインスリンレセプター異常症が発見され、変異の種類により患者の検査結果と症状が多彩であることが明らかとなってきた(文献2/M. Taira et al., Science 245:63-66, 1989、文献3/F. Shimada et al., Lancet 335:1179-1181, 1990)。これにより2型糖尿病の発症原因の一部にインスリンレセプター遺伝子異常が存在する可能性が示唆された。実際本発明者らは、2型糖尿病の遺伝子診断を可能とする多型の1つを明らかにし、既に特許出願している(特許文献1/特開平8-103280)。

#### 【0008】

インスリンレセプターは、 $\alpha$ と $\beta$ の2つのサブユニットで構成されるヘテロ4量体構造の受容体蛋白質である。 $\alpha$ サブユニットは細胞外にあり、 $\beta$ サブユニットは細胞膜を貫通している。 $\alpha$ サブユニットはそのC末端側にあるCys残基のSH基を介して、 $\beta$ サブユニットの細胞外ドメインとSS結合によって結合している。

インスリンが $\alpha$ サブユニットと結合すると、 $\beta$ サブユニットの細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化され、インスリンのシグナルが細胞に伝達される。細胞膜にあったインスリンレセプターは、インスリンとの結合の後にエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる(受容体の半減期は7時間)。インスリ

ンセプターの数はインスリン濃度の増加に伴って減少する。これを下降調節 (down regulation) という。

### 【0009】

本発明者らによって見出されたインスリンレセプターの多型は、 $\beta$ サブユニットの831位のThrがAlaに変異している(IRA831)。このアミノ酸の置換を原因とするインスリンレセプターの機能異常は確認されなかった。しかし、遺伝統計学的にはIRA831と2型糖尿病との強い関連性が示された。

一方、最近、いくつかの疾患においてレセプターの異常に基づく疾患、血中にフリーのレセプターが存在することによる疾患が報告されている(文献4／Frode TS, Tenconi P, Debiasi MR, Medeiros YS "Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 soluble receptor and different inflammatory parameters in patients with rheumatoid arthritis." *Mediators Inflamm.* 2002 Dec; 11(6) : 345-9、文献5／Baron AT, Cora EM, Lafky JM, Boardman CH, Buenafe MC, Rademaker A, Liu D, Fishman DA, Podratch KC, Maihle NJ "Soluble Epidermal Growth Factor Receptor (sEGFR/sErbB1) as a potential Risk, Screening, and Diagnostic Serum Biomarker of Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb ; 12(2) : 103-13、文献6／Beguin Y. "Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status." *Clin Chem Acta*, 2003 Mar ; 329(1-2) : 9-22)。また、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを血中に放出するトランスジェニックマウスにおいて、高血糖、高インスリン血症が観察されている(文献7／ERIK M. SCHAEFER et al. *DIABETES* vol.43, 143-153 ; 1994)。しかし、ヒトにおいて血中に遊離のインスリン受容体が存在することは報告されていない。

### 【0010】

【文献1】 Taylor, S. I. *Diabetes* 41:1473-1490, 1992

【文献2】 M. Taira et al., *Science* 245:63-66, 1989

【文献3】 F. Shimada et al., *Lancet* 335:1179-1181, 1990

【文献4】 Frode TS et al., *Mediators Inflamm.* 2002 Dec; 11(6) : 345-9

【文献5】 Baron AT et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb ; 1

2(2) : 103-13

【文献6】 Beguin Y, Clin Chem Acta, 2003 Mar ; 329(1-2) : 9-22

【文献7】 ERIK M. SCHAEFER et al. DIABETES vol.43, 143-153 ; 1994

【特許文献1】特開平8-103280

### 【0011】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血中に存在する遊離のインスリンレセプターの $\alpha$ サブユニットの測定方法の提供を課題とする。

### 【0012】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明らは、インスリンの作用を妨げる原因について研究を続けた。そして、血中に遊離の状態で存在するインスリンレセプターの $\alpha$ サブユニットが、インスリンの作用を妨げ、高血糖をもたらすことを明らかにした。本発明者らは、生体における遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと糖尿病の関係についての解析を進めるために、その測定系を確立する必要があると考えた。そこで本発明者らは、血中に遊離した $\alpha$ サブユニットの測定方法を確立し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法、並びに測定用試薬に関する。

〔1〕次の工程を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法。

(1) 血液試料をインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体と接触させる工程、

(2) 前記抗体と血液中に存在するインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの結合を検出する工程、および

(3) 両者の結合のレベルに基づいて血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの量を決定する工程

〔2〕前記インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体が固相に結合しているか、または固相に結合可能な標識を有する第1の抗体であり、第1の抗体に結合したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットをインスリンレセプター $\alpha$ サブ

ユニットを認識する第2の抗体の結合によって検出する工程を含む、〔1〕に記載の方法。

〔3〕インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定用試薬。

### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、次の工程を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法を提供する。

- (1) 血液試料をインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体と接触させる工程、
- (2) 前記抗体と血液中に存在するインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの結合を検出する工程、および
- (3) 両者の結合のレベルに基づいて血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの量を決定する工程

### 【0014】

本発明において、「遊離」とは、当該分子が血液中に分散して存在していることを言う。通常インスリンレセプターは、細胞膜表面に局在する蛋白質である。更に、インスリンレセプターは、骨格筋、脂肪組織、肝臓、脳などに多くに発現していることが明らかにされている。つまり、リンパ球などの血液細胞では、インスリンレセプターの顕著な発現は見られない。したがって、血中には遊離のインスリンレセプターが存在するか否か不明であった。ところが実際には、血液中にもインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが遊離していることが本発明者らによって明らかにされた。

### 【0015】

インスリンレセプターの測定方法については、既に公知 (Human insulin receptor radioimmunoassay : applicability to insulin-resistant state. Am. J. Physiol. 257 (Endocrinol. Metab. 20) E451-E457, 1989) である。しかし血中に遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが存在することは知られていないし、その測定方法も、確立されていない。わずかに血中における $\alpha$ サブユニットの存在

の可能性を指摘した文献 (J Clin Endocrinol Metab. 1992 May;74(5):1116-21.) があるのみである。

#### 【0016】

本発明において、血中に存在するインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットは、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体との結合を利用して測定することができる。本発明に用いるインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体は、公知の方法によって得ることができる。

#### 【0017】

たとえばインスリンレセプターの組み換え体を免疫原として、本発明に必要な抗体を得ることができる。本発明者らは、後に述べるようなアミノ酸配列をコードするcDNAの利用により、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを細胞外に分泌させることができることを明らかにした。このようにして得ることができる分泌型のポリペプチド、あるいはその断片等も本発明の抗体を得るための免疫原に利用することができる。これらのポリペプチドは、公知のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットのcDNA、あるいは配列番号：1に示す塩基配列（またはその断片）を発現可能に保持するベクターで適当な宿主を形質転換することによって得ることができる。

#### 【0018】

必要な塩基配列からなるDNAは、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット発現組織から調製したmRNAを利用してクローニングすることができる。あるいは、公知のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットのcDNAの塩基配列を改変して配列番号：1に示した塩基配列からなるDNAを得ることもできる。このようにして発現されたインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの組み換え体は、本発明に用いる抗体を得るための免疫原として好ましい。

#### 【0019】

あるいは、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットのドメインペプチドを免疫原に用いることもできる。免疫原とするドメインペプチドは、ペプチド合成装置によって容易に合成することができる。合成ペプチドはキャリアタンパク質に結合させることによって、免疫原とすることができます。

合成ペプチドをキャリア蛋白質に結合させるためには、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロスクシンイミド法 (maleimidobenzoyl-N-hydrosuccinimide method、以下MBS法と省略する) 等が一般に用いられている。具体的には、合成ペプチドにシステインを導入し、そのSH基を利用してMBSによってKLHと架橋させる。システイン残基の導入は、合成したペプチドのN末端であっても、C末端であってもよい。なおキャリアタンパク質には、KLHのほかにもウシ血清アルブミン等の任意のタンパク質を用いることができる。KLHは、免疫原性が強いことから好ましいキャリアタンパク質のひとつである。

### 【0020】

こうして得られた免疫原を、適当なアジュバントと混合して免疫動物に免疫する。アジュバントには、フロイントコンプリートアジュバント(FCA)、あるいはインコンプリートアジュバント等が公知である。免疫操作は、抗体価の上昇が確認されるまで適当な間隔で繰り返される。本発明における免疫動物は特に限定されない。具体的には、マウス、ラット、あるいはウサギなどの一般的な免疫動物を利用することができる。

抗体をモノクローナル抗体として得る場合には、その產生に有利なものを利用すれば良い。たとえばマウスでは、細胞融合用の骨髄腫細胞株が多く知られているうえに高い確率でハイブリドーマを樹立可能な技術が既に確立されている。したがってマウスは、望ましい免疫動物のひとつである。

更に、免疫処理は *in vivo* に限定されない。培養した免疫担当細胞をインビトロで免疫感作する方法を採用することもできる。これらの方法によって得られた抗体産生細胞を、形質転換させクローニングを行う。モノクローナル抗体を得るために抗体産生細胞を形質転換する方法は、細胞融合に限定されない。たとえば、ウイルスの感染によってクローニング可能な形質転換体を得る方法が知られている。

### 【0021】

本発明に用いるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、各種の抗原に対する反応性に基づいてスクリーニングすることができる。具体的には、まず、免疫原として用いたインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットやそのドメインペプ

チドに対する結合活性を指標に抗体産生細胞を選ぶ。スクリーニングで選び出されたポジティブクローニングは、必要に応じてサブクローニングされる。

#### 【0022】

樹立したハイブリドーマを適当な条件の下で培養し、産生される抗体を回収すれば本発明に用いるモノクローナル抗体を得ることができる。ハイブリドーマは、ホモハイブリドーマの場合には同系の動物の腹腔に接種して生体内培養が可能である。この場合、モノクローナル抗体は腹水として回収される。ヘテロハイブリドーマの場合にはヌードマウスを宿主として生体内培養が可能である。

#### 【0023】

生体内培養のみならず、適当な培養環境を与えて生体外で培養することも一般に行われている。たとえばRPMI1640やDMEM等の基礎培地がハイブリドーマの培地として一般に利用されている。これらの培地には、抗体産生能を高く維持するために動物血清等の添加剤を加えることができる。生体外でハイブリドーマを培養する場合には、モノクローナル抗体は培養上清として回収することができる。培養上清は、培養終了時に細胞から分離することにより回収することもできるし、あるいはホローファイバーを応用した培養装置においては、培養を継続しながら連続的に回収することも可能である。

#### 【0024】

腹水や培養上清として回収したモノクローナル抗体は、飽和硫酸安塩析によりそのイムノグロブリン分画を分取し、更にゲルろ過やイオン交換クロマトグラフィー等の精製工程を経て本発明に用いるモノクローナル抗体とする。この他にモノクローナル抗体がIgGであれば、プロテイジンAカラムやプロテインGカラムによるアフィニティクロマトグラフィーに基づく精製方法が有効である。

#### 【0025】

一方、本発明に用いる抗体をポリクローナル抗体として得るには、免疫後に抗体価の上昇した個体から採血し、その血清を分離することにより抗血清を得ることができる。抗血清から公知の方法でイムノグロブリンを精製し、本発明に用いる抗体とすることができます。イムノグロブリンの精製において、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットをリガンドとするイムノアフィニティクロマトグラフィー

を組み合わせれば、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット特異抗体とすることができる。

#### 【0026】

インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに対する抗体が、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと接触すると、抗体は、抗原抗体反応によって当該抗体が認識する抗原決定基（エピトープ）に結合する。抗原に対する抗体の結合は、各種のイムノアッセイの原理によって検出することができる。イムノアッセイは、不均一系の分析方法と、均一系の分析方法に大別される。イムノアッセイの感度と特異性を高い水準に維持するためには、モノクローナル抗体の利用が望ましい。各種のイムノアッセイフォーマットによる本発明のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法について、具体的に述べる。

#### 【0027】

まず、不均一系イムノアッセイによるインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法について述べる。不均一系イムノアッセイにおいては、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに結合した抗体を結合しなかったものと分離して検知するしくみが必要である。

#### 【0028】

分離を容易に行うために固相化試薬が一般に用いられる。たとえば、まずインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体を固定した固相を用意する（固相化抗体）。これにインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを結合させ、更に標識した第2抗体を反応させる。

#### 【0029】

固相を液相から分離し、更に必要に応じて洗浄すれば、固相上にはインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの濃度に比例して第2抗体が残る。第2抗体を標識しておけば、この標識に基づくシグナルを測定することによりインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを定量することができる。

#### 【0030】

抗体の固相への結合方法は、任意である。たとえばポリスチレンなどの疎水性素材には、抗体を物理的に吸着させることができる。あるいは、各種の官能基を

表面に有する素材に対して、抗体を化学的に結合させることもできる。更に、結合性のリガンドで標識された抗体を、当該リガンドの結合パートナーで捕捉することによって固相に結合することもできる。結合性リガンドとその結合パートナーの組み合わせとしては、アビシンービオチンなどを示すことができる。固相と抗体とは、第2抗体との反応と同時、あるいはその後に結合させることができる。

同様に第2抗体の標識化も、必ずしも直接標識でなくてもよい。すなわち、抗体に対する抗体や、アビシンービオチンといった結合性の反応を利用して間接的に標識することもできる。

#### 【0031】

インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット濃度が既知の標準試料によって得られたシグナル強度に基づいて、試料中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット濃度が決定される。

#### 【0032】

上記不均一系イムノアッセイのための固相化抗体および第2抗体は、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体、あるいはその抗原結合部位を含む断片であれば、任意の抗体を利用することができる。したがって、モノクローナル抗体、ポリクローナル、あるいは両者の混合物や組み合わせであってよい。なお両者をモノクローナル抗体とするときには、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体を組み合わせるのが好ましい。

#### 【0033】

このような不均一系イムノアッセイは、測定対象抗原を抗体で挟むことからサンドイッチ法と呼ばれている。サンドイッチ法は、測定感度や再現性に優れるため、本発明における好ましい測定原理の1つである。

#### 【0034】

不均一系のイムノアッセイには、競合阻害反応原理を応用することもできる。すなわち、抗体に対する既知濃度のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの結合を、試料中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが競合的に阻害する現象に基づくイムノアッセイである。既知濃度のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを

標識しておき、抗体に反応した（またはしなかった）インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを測定すれば試料中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット濃度を決定することができる。

### 【0035】

既知濃度の抗原と試料中の抗原とを同時に抗体に反応させれば競合的な反応系が成立する。また試料中の抗原と抗体の反応後に既知濃度の抗原とを反応させれば、阻害的な反応系による分析が可能である。いずれの反応系においても、抗体、あるいは試薬成分として用いる既知濃度の抗原のいずれか一方を標識成分とし、他方を固相化試薬としておくことにより操作性に優れる反応系を構成することができる。

### 【0036】

これら不均一系のイムノアッセイにおいて、標識成分としては放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、酵素活性物質、肉眼的に観察可能な物質、あるいは磁気的に観察可能な物質などが用いられる。これらの標識物質の具体例を以下に示す。

酵素活性物質：

ペルオキシダーゼ

アルカリホスファターゼ

ウレアーゼ、カタラーゼ

グルコースオキシダーゼ

乳酸脱水素酵素、あるいは

アミラーゼ等

蛍光物質：

フルオレセインイソチオシアネート、

テトラメチルローダミンイソチオシアネート、

置換ローダミンイソチオシアネート、あるいは

ジクロロトリアジンイソチオシアネート等

放射性同位元素：

トリチウム、

125I、あるいは

181I等

中でも酵素のような非放射標識は、安全性、操作性、感度等の点で有利な標識のひとつである。酵素標識と抗体、あるいはインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットとは、過ヨウ素酸法やマレイミド法等の公知の方法により結合することができる。

#### 【0037】

一方、固相としては、ビーズ、容器内壁、微粒子、多孔質担体、あるいは磁性粒子などが用いられる。これらの固相は、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、ガラス、金属、あるいはセラミック等の素材を利用して成型されたものを利用できる。これらの固相素材の表面に、抗体等を化学的に結合するための官能基を導入した固相素材も知られている。固相と抗体（あるいは抗原）についても、ポリ-L-リジンやグルタルアルデヒド処理といった化学的な結合や、物理吸着といった公知の結合方法を応用することができる。

#### 【0038】

ここで例示した不均一系のイムノアッセイでは、いずれも固相／液相の分離工程や洗浄工程が必要となるが、サンドイッチ法の変法であるイムノクロマトグラフ法によれば、これらの工程を簡単に処理することが可能である。

すなわち、毛管現象によって試料溶液の移送が可能な多孔質担体に固相化抗体を固定し、その中を標識抗体と混合したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット含有試料を毛管現象によって展開する。展開中にインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットは標識抗体と反応し、更に固相化抗体と接触すると、その位置に捕捉される。インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと反応しなかった標識抗体は、固相化抗体に捕捉されることなく通過する。

#### 【0039】

結果的に固相化抗体の位置に残る標識抗体のシグナルを指標にインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの存在を検知することができる。標識抗体を多孔質担体の

上流に予め保持させておけば、試料溶液の滴下だけで全ての反応が開始し完結するので、きわめて簡便な反応系を構成することができる。イムノクロマトグラフ法においては、着色粒子のような肉眼的に識別しうる標識成分を組み合わせることにより、特殊な読取装置さえ不要な分析デバイスを構成することができる。

#### 【0040】

続いて均一系のイムノアッセイについて説明する。以上のような反応液の分離を必要とする不均一系の免疫学的分析方法に対して、均一系の分析方法によってもインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを測定することができる。均一系の分析方法では、抗原抗体反応の反応生成物を反応液から分離することなく検出することができる。

#### 【0041】

抗原抗体反応に伴って生成する沈降物を観察することにより、抗原性物質の定量的な分析を行う免疫学的沈降反応は、代表的な均一系の分析方法である。免疫学的沈降反応にはポリクローナル抗体を利用するのが一般的である。モノクローナル抗体を応用する場合には、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに対して異なるエピトープに結合する複数種のモノクローナル抗体を利用するのが好ましい。免疫学的な反応に伴う沈降反応生成物は、肉眼的に観察することもできるし、あるいは光学測定することにより数値化することもできる。

#### 【0042】

液相中の免疫学的な複合体の形成を利用したこれらの免疫学的分析方法に対して、ゲル中で反応を行う方法も公知である。たとえば、オクテロニー法、SRID法、あるいは免疫電気泳動法などがそうである。これらのゲル中での反応に基づく分析方法においても、複数種のモノクローナル抗体の利用によって明瞭な沈降線を観察できるようになる。

#### 【0043】

抗体を感作した微粒子の抗原による凝集を指標とする免疫学的粒子凝集反応も、一般的な均一系の分析方法である。この方法でも先に述べた免疫学的沈降反応と同じように、ポリクローナル抗体、あるいは複数種のモノクローナル抗体の組み合わせを利用することができる。微粒子への抗体の感作は、抗体の混合物を感

作しても良いし、あるいは抗体ごとに感作した粒子を混合することによって調製することもできる。こうして得られた微粒子は、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットとの接触により、マトリクス状の反応生成物を生じる。反応性生物は、粒子の凝集として検出することができる。粒子の凝集は、肉眼で観察することができるし、光学測定することにより数値化することもできる。

#### 【0044】

均一系のイムノアッセイとして、エネルギー転移や酵素チャンネリングに基づく免疫学的分析方法が知られている。エネルギー転移を利用した方法においては、抗原上の接近したエピトープを認識する複数の抗体に対して、それぞれドナー／アクセプターの関係にある異なる光学標識を結合させるようとする。免疫学的な反応が起きると両者が接近するため、エネルギー転移現象が生じ、消光や蛍光波長の変化といったシグナルにつながる。一方、酵素チャンネリングとは、やはり接近したエピトープに結合する複数の抗体に対し、一方の反応生成物が他方の基質となっているような関係にある酵素の組み合わせを標識として利用する。免疫学的な反応によって両者が接近すると、酵素反応が促進されることから両者の結合を酵素反応速度の変化としてとらえることができる。

#### 【0045】

本発明はまた、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体を含む、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定用試薬を提供する。血中に遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが存在することは本発明者らが得た新規な知見である。したがって、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを認識する抗体が、血中の遊離インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット測定用試薬として有用であることも新規に見出された知見である。本発明の測定用試薬を構成する抗体は、上記のようなアッセイフォーマットに応じて、標識したり、あるいは固相に結合しておくことができる。

ここに例示した各種免疫学的分析方法に必要な標識抗体（あるいは抗原）や固相化抗体（あるいは抗原）は、濃度を検定したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット標準、希釈や洗浄に用いられる緩衝液等と組み合わせたキットとすることができる。

## 【0046】

本発明によるインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法には、血液試料が用いられる。血液試料とは、全血、全血から分離された血清や血漿が含まれる。全血は、血球成分を溶血させた後に、分析試料とすることもできる。更に、血液試料は、必要に応じて希釀することができる。

血中にインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが遊離の状態で存在していることは、本発明者らによって明らかにされた新規な知見である。血中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットは、健常者にも見出される。しかしマウスを用いた実験では、血中へのインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの投与は、高血糖とインスリン分泌量の上昇をもたらした。したがって、血中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットは、糖尿病(2型糖尿病)のリスクファクター、あるいは2型糖尿病の増悪因子として重要である。そして、生体における血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定は、被検者の糖尿病のリスクを評価するために有用な情報であると言える。

## 【0047】

本発明者らは、血中に遊離型のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが存在することを明らかにした。遊離型のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットをイムノアッセイによって測定するためには、それを認識する抗体が必要である。また、その抗体に対して生体中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと同様の反応性を有する標準試料として利用可能な抗原が必要である。本発明は、このような抗体を得るために免疫原、あるいは標準試料として利用することができるインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの製造に有用なポリヌクレオチドを提供する。

## 【0048】

すなわち本発明は、以下の(a)-(b)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに関する。

- (a)配列番号：1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド
- (b)配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド
- (c)配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハ

イブリダイズし、かつインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットとの免疫学的同等性を有する分泌型のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列と90%以上のホモジーを有し、かつインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットとの免疫学的同等性を有する分泌型のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

#### 【0049】

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドは、ヒトインスリンレセプター遺伝子中、それぞれ以下の領域を構成するアミノ酸配列をコードしている。カッコ内に各領域の配列番号：2における位置を示した。また配列番号：1に記載の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列は、図2にアンダーラインをつけて示した。

シグナルペプチド（-27～-1）

$\alpha$ サブユニット（1～735）、および

$\beta$ サブユニットの一部（736～926）

このようなポリヌクレオチドは、配列番号：1に示した塩基配列に基づいて、当業者が合成することができる。あるいは公知のインスリンレセプターのcDNAから、必要な塩基配列を取得することもできる。たとえば実施例においては、ヒトインスリンレセプター遺伝子を制限酵素SspIで消化することにより、配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドを得ている。

#### 【0050】

本発明者らは、ヒトインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに対して $\beta$ サブユニットの一部を付加したアミノ酸配列を発現させたときに、発現生成物が細胞外に効率的に分泌されることを見出した。一般に細胞膜上に発現するレセプター分子は、細胞膜成分の除去が障害となって、精製が容易でない。あるいは細胞膜成分の除去によって、レセプター分子そのものの構造が維持できなくなる場合があった。したがって、レセプター分子を分泌型の蛋白質として発現させることは、製造技術として有用である。

#### 【0051】

本発明は、遊離型のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの標準試料あるいは

免疫原として有用なポリペプチドの産生を目的とする。細胞外に分泌された組み換え体は、生体における存在形態と同じ遊離型の分子とみなすことができる。つまり、たとえば組織から抽出された細胞膜上のレセプター分子に比べて、分泌型の蛋白質として発現させた本発明のポリペプチドは、標準試料あるいは免疫原として好ましい。

#### 【0052】

本発明のポリヌクレオチドは、前記(c)または(d)に記載のポリヌクレオチドを含む。本発明において、免疫学的同等性は、抗体との反応性に基づいて決定することができる。すなわち、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに対する抗体の反応性を、ある蛋白質が吸収するとき、この蛋白質は、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと免疫学的に同等であると言うことができる。更にある蛋白質を適当な宿主細胞において発現させたときに、その蛋白質が細胞の培養上清に分泌されれば、当該蛋白質が分泌型であることを証明することができる。通常、インスリンレセプター遺伝子を形質転換体において発現させた場合には、 $\beta$ サブユニットの膜貫通ドメインの機能によって、レセプター分子は細胞膜上に局在し、培養上清中に $\alpha$ サブユニットを見出すことは難しい。

#### 【0053】

前記インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットと免疫学的に同等なタンパク質において変異するアミノ酸の数は、免疫学的な同等性を保持する限り制限されない。インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの場合、変異するアミノ酸の数は通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは50アミノ酸以内であり、さらに好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内である。またその変異部位は、免疫学的な同等性を保持する限り制限されない。

#### 【0054】

アミノ酸配列の変異は、人為的なものであっても、自然において生じる変異であってもよい。アミノ酸を置換する場合には、保存的置換を利用することができる。一般に蛋白質の機能の維持のためには、置換するアミノ酸は、置換前のアミノ酸と類似の性質を有するアミノ酸であることが好ましい。このようなアミノ酸残基の置換が、保存的置換と呼ばれている。

例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、いずれも非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有する。また、非荷電性のアミノ酸としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。あるいは、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。更に、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。これらの各グループを構成するアミノ酸は、互いに似た性質を有している。そのため、グループ内の他のアミノ酸に置換したときに、蛋白質の機能が維持される可能性が高い。

このような蛋白質は、配列番号：1に記載の塩基配列に変異を導入することによって得ることができる。既知の塩基配列からなる遺伝子に変異を導入する技術は公知である。あるいは、化学合成によって目的とするアミノ酸配列からなる蛋白質を調製することもできる。

### 【0055】

また、前記免疫学的に同等なタンパク質を単離するための他の方法としては、ハイブリダイゼーションスクリーニングを利用することができます。たとえば、配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその断片を利用して、これと相同意の高いDNAを単離することは当業者にとって容易である。次に、こうして単離されたDNAの中から、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと免疫学的に同等な蛋白質をコードするDNAを選択することも、当業者が通常行いうることである。

このように配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするポリペプチドであって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと免疫学的に同等なポリペプチドもまた本発明のポリペプチドに含まれる。免疫学的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、当業者であれば適宜選択することができる。

### 【0056】

ハイブリダイゼーションの条件としては具体的には、例えば5×SSC、ホルムアミド非存在下で25℃の条件が挙げられる。好ましくは6×SSC、40%ホルムアミドで25℃で行う。更に好ましくは5×SSC、50%ホルムアミドで40℃で行う。ハイブ

リダイゼーション後の洗浄は、例えば、2×SSC、37°Cで洗浄する。好ましくは1×SSC、55°Cで洗浄する。更に好ましくは1×SSC、60°Cで洗浄する。

### 【0057】

また、ハイブリダイゼーションスクリーニングに代えて、配列番号：1に記載の塩基配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCR法を利用して本発明のポリヌクレオチドを単離することもできる。

### 【0058】

上記ハイブリダイゼーションスクリーニングまたはPCR法により単離することができる、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと免疫学的に同等なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、通常、配列番号：1に記載の塩基配列と高い相同性を有する。本発明における高い相同性とは、ポリヌクレオチドの一部ではなく全体にわたって少なくとも20%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上、さらに好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上の配列の同一性を有することを言う。塩基配列の相同性を決定するためのアルゴリズムが公知である（宮田隆ら著「コンピューターによる遺伝子のホモロジー解析」（遺伝子研究法I、東京化学同人））。

### 【0059】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、組み換えタンパク質の生産に用いることが可能である。本発明のポリペプチドを組み換えタンパク質として生産するための宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を用いることができる。宿主細胞に応じて、それぞれ適切なベクターが特定される。各宿主細胞には、たとえば次のような発現ベクターを用いることができる。

大腸菌：pGEX5X-3（ファルマシア）など

酵母：pYES2（インビトロゲン）など、

昆虫細胞：pVL1392（インビトロゲン）など、

動物細胞：pRc/CMV2（インビトロゲン）など

これらのベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などが当業者に知られている。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法を挙げることができる。物理的方法としては、例え

ば、エレクトロポレーション法、ジーンガン(GENE GUN)法、あるいはマイクロインジェクション法が挙げられる。また、化学的方法としては、例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、DEAE-Dextran法が挙げられる。

宿主内で生産された組換えタンパク質は、任意の方法で精製することができる。具体的には、イオン交換カラム法、アフィニティーカラム等を利用する方法などが一般に用いられている。組み換えタンパク質をGSTや6×Hisなどとの融合タンパク質として発現させることによって、検出や精製を容易にする方法も公知である。

#### 【0060】

前記(a)-(d)に記載されたポリヌクレオチドは、いずれもインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット（または免疫学的同等性を有するポリペプチド）を分泌型の蛋白質として発現させるために利用することができる。細胞外に分泌されたインスリン $\alpha$ サブユニットは、培養上清から容易に回収することができる。あるいは、培養上清をそのまま標準試料や免疫原として用いることもできる。

#### 【0061】

たとえば、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを測定するための標準試料は、次のようにして製造することができる。まず、前記の形質転換体の培養上清を回収する。回収された培養上清は、そのまま、あるいは目的の発現生成物を精製した後に、発現生成物の量を検定する。発現生成物が純粋な蛋白質として精製された場合には、その蛋白質濃度を測定することによって、発現生成物の量を決定することができる。あるいは培養上清のように、もしも不純物が混在するときには、各種のクロマトグラフィーや電気泳動法などによって、目的とする発現生成物を単離して、その量を決定することができる。発現生成物の量が決定されれば、当該蛋白質の標準試料として利用することができる。

#### 【0062】

なお、配列番号：2に記載のアミノ酸配列は、ヒトのインスリンレセプターに由来するアミノ酸配列である。このアミノ酸配列に対して、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現生成物として利用した場合には、両者のアミノ酸配列の相違に基づいて、分子量の相違を補正することができる。

## 【0063】

本発明において、ある蛋白質の標準試料とは、当該蛋白質としてどれだけの量の蛋白質が含まれているのかを、予め決定した試料を言う。標準試料は、必要に応じて希釈系列とすることができる。希釈系列について、先に述べたようなイムノアッセイによってシグナルが計測される。標準試料の蛋白質濃度と計測されたシグナルの関係を、標準曲線 (standard curve、または検量線) として表すことができる。こうして作製された標準曲線に基づいて、実際の被検試料から得られたシグナルから当該試料に含まれる測定対象物質の濃度を決定することができる。あるいは希釈系列の測定結果に基づいて回帰式を作製し、被検試料の測定値を代入することによって、当該試料に含まれる測定対象物質の濃度を決定することもできる。

以下実施例に基づいて、本発明をより具体的に説明する。

## 【0064】

## 【実施例】

1. ヒトインスリン受容体  $\alpha$  サブユニットcDNAの構築

CHO細胞でインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットを培養上清中に分泌させるためのcDNAを構築した。本実施例において構築したcDNAの構造を図1に示す。ヒトインスリン受容体の全長cDNA (NM\_000208) を含むpcDL1-HIR717 (Ebina et al. Cell 1. 40, 747-758, 1985) を利用し、異なる位置で切断して各cDNAを得た。各cDNAはそれぞれ次に示すような構造を有する。

## 【0065】

CHO-HIR：インスリンレセプター  $\alpha$  サブユニット +  $\beta$  サブユニット

CHO-HIR( $\alpha$ )：インスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットのみ

CHO-HIR(PstI)： $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットのN末端側1-150アミノ酸

CHO-HIR(SspI)： $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットのN末端側1-191アミノ酸

$\beta$  サブユニットの膜貫通ドメインは、N末端側195-217に位置する。つまりCHO-HIR(PstI)およびCHO-HIR(SspI)は、いずれも  $\beta$  サブユニットの一部を含むが、膜貫通ドメインは欠いている。図2において、 $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列 (C末端側の小文字の部分) のうち、ボックスで囲んだ部分が膜貫通領域に

相当する。

各cDNAを動物細胞発現ベクターpCXN2に挿入してhIRおよびその改変体の発現プラスミドを得た。それぞれの制限酵素はTakara(Otsu, Japan)及びNew England Biolabs(Beverly, MA)より購入した。

### 【0066】

#### 2. 培養および遺伝子導入

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、F-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12, Invitrogen, Carlsbad, CA) 培地を用いて5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。10 μgの1で得た各発現プラスミドを制限酵素Sca Iにより直線化し、0.5 μg プラストサイジン(pSV2-bsr, Funakoshi, Tokyo, Japan)と共にエレクトロポレーションによりCHO細胞に導入した。トランスフェンションから24時間後より10 μg/ml プラストサイジン耐性F-12培地に交換し、2週間後に残ったコロニーを単離した。hIRの発現については、ポリアクリルアミド電気泳動および抗IRa抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

### 【0067】

#### 3. αサブユニットの精製

発現量の高いクローニングを10% FCSを含むF-12培地で増幅し、150 mm細胞培養ディッシュ(Corning)を用いて培養した。100%まで培養後、HEPES緩衝液 [20 mM HEPES (pH 7.4), 140mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>] で3回洗浄後、ディッシュ1枚あたり20 mlの無血清培地(CHO-S-SFM II DPM, Invitrogen)に交換した。

### 【0068】

4日間培養した培地を回収し、遠心分離(1300×g、10分、4°C)により細胞成分を除去した後の上清を集めた。上清1 mlあたり6 μl(50% 懸濁液)の小麦胚芽レクチン(WGA)アガロース (Amersham)を加え、4 °Cで2時間ローテートして吸着させた。アガロースは5回洗浄した。1回目と5回目はHEPES緩衝液 [50 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl, 1% Triton X-100] で洗浄した。2～4回目の洗浄液は、塩濃度を500 mMとした。吸着したタンパクは0.2 M N-アセチルグルコサミン含有HEPES緩衝液で溶出した。抗インスリンレセプター (αサブユニット抗体

、イムノテック0365) 抗体カラム(ベットボリューム；0.5 mL)に溶出したサンプルを加えて4 °C で1時間ローテートして吸着させた。ベットボリュームの10倍量のHEPES緩衝液でカラムを3回洗浄したが、この時も2回目の洗浄は塩濃度を500 mMに高めた。1.5M MgCl<sub>2</sub>含有ホウ酸ナトリウム緩衝液で200 μLずつ分取した。

#### 【0069】

各フラクションにおけるインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの精製度は、次のようにして評価した。まずそれぞれのフラクションから20 μLをとり、7.5% SDS-PAGE及び銀染色を行った。染色後のゲルを写真を図3に示した。インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットに相当する分子量を有する蛋白質が、ほぼ純粋な蛋白質として単離されていることが確認できた (IR $\alpha$ で示したバンド)。染色後のゲルを透過型スキャナーで読みとりNIHイメージソフトウェアで評価した。蛋白質濃度はprotein assay dye reagent (BioRad, Hercules, CA)を用いてBSAを標準にしてBradfold法により定量した。

#### 【0070】

#### 4. 抗ヒトインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット抗体の作製

精製したヒトインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを用いて、ウサギ（日本白色メス 3.5kg）に対し皮下免疫した（約10箇所、1回/週）。5回免疫後に耳下静脈より少量を採血し、血清を分離してELISAにより抗体価をチェックした。

#### 【0071】

まず1/100M生理的リン酸化緩衝食塩液 (PBS) にヒトインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを溶解して0.1mg/mLの溶液を調製し、この溶液をヌンク社製96穴マイクロプレート「マキシソープ」に100 μL添加した。室温 (20~25°C) で3時間放置した後、ウエル内の溶液を吸引除去し、5%のウシ血清アルブミンを含むPBS 30 μLを加えた。約18時間4°Cに静置し、カップの未反応部分をブロックした。ブロッキング液を除き300 μLのPBSで3回洗浄してELISA用プレートとした。

#### 【0072】

PBSで希釈した抗血清を希釈し、希釈の系列を作製した。希釈した抗血清100 μLをELISAプレートの各ウエルに加えた。室温 (20~25°C) で1時間静置した後、反応液を除き、続いて30 μLのPBSで4回洗浄した。次に、希釈したペルオキシダ

一ゼ標識抗ウサギIgG（（株）医学生物学研究所製）100 $\mu$ Lを加えた。室温（20～25℃）で1時間静置反応させた後、再度30 $\mu$ LのPBSで4回洗浄した。

### 【0073】

洗浄後のウエルに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと過酸化水素の溶液100 $\mu$ Lを発色基質として加えた。一定時間反応させた後1規定硫酸を添加して反応を停止し、波長450nmにおける吸光度を測定した。測定結果を図4のグラフに示す。この結果から明らかのように、得られた抗血清は十分な抗体価を示した。このように十分な抗体価を示したウサギについては耳下静脈より70mlの採血を行い、約30mlの抗血清を得た。さらに、このようにして得たポリクローナル溶液からDEAEセルロースカラムを用いてIgG分画を精製した。

### 【0074】

#### 5. 標識抗体の作製

0. 1M炭酸緩衝液(pH8.5)に溶解した抗ウサギIgGモノクローナル抗体(2B9、5 $\mu$ g/mL)とNHS-LC-BIOTIN（PIERC社製 25 $\mu$ g/mL）を混合し、室温で4時間スターラーを用いて攪拌した。IgGとNHS-LC-BIOTINは、モル比が1：60になるように混合した。攪拌後、この溶液を生理的リン酸緩衝液（PBS）に透析し、ビオチン標識抗体を得た。

### 【0075】

#### 6. ヒトインスリン受容体 $\alpha$ サブユニットのELISAの構築

抗ヒトインスリン受容体 $\alpha$ サブユニット抗体を40 g/mL～80 g/mLの濃度になるように0.1M炭酸塩緩衝液(pH9.6)で希釈調製した。希釈した抗体溶液を96穴のマイクロプレート（NUNC社製、イムノブレークアパートモジュールマキシソープ#473768）の各ウエルに100  $\mu$ Lずつ分注した。マイクロプレートは、湿潤箱中で2～8℃、一晩放置して抗体を結合させた。

### 【0076】

インキュベート後、抗体溶液を捨て、PBSで2回洗浄した。余分な水分を除去した後ブロッキング液（1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>を含むPBS）を1ウエル当たり200  $\mu$ L加えた。マイクロプレートを湿潤箱中で2～8℃、一晩静置してブロッキングした。ブロッキング後、ブロッキング液を捨て余分な水分を除去した。更にプレート

を風乾し、使用時まで乾燥剤と共にアルミ袋に保存した。

### 【0077】

#### 6. ELISAの評価

精製ヒトインスリン $\alpha$ サブユニットを検体希釈用緩衝液 (20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% BSA, 10% 正常マウス血清、25mg/mL MAK33, 0.1%NaN<sub>3</sub>、1% ウシ $\gamma$ -グロブリン、0.056% Tween 20, pH7.5) で希釈しスタンダードとした。検体は検体希釈液で2倍希釈し、抗体感作マイクロプレートに1ウエル当たり100 $\mu$ Lずつ分注して室温で3時間反応させて抗体・抗原複合物を形成させた。

### 【0078】

反応後のウエルを、洗浄用緩衝液 (PBS+0.05% Tween 20) で5回洗浄した。余分な水分を除いた後、検体希釈用緩衝液で希釈したビオチン標識抗体を1ウエル当たり100 $\mu$ Lずつ分注し、室温で3時間反応させた。反応後、同じ洗浄用緩衝液で5回洗浄した。余分な水分を除いた後、アビジンHRP希釈用緩衝液 (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% BSA, 0.15% Proclin, pH7.5) で希釈したアビジン標識ペルオキシダーゼを1ウエル当たり100 $\mu$ L添加して室温で3時間反応させた。この反応により、抗体・抗原・ビオチン化抗体・アビジン標識ペルオキシダーゼ複合物を形成させた。

### 【0079】

反応後のウエルを洗浄用緩衝液で5回洗浄した。余分な水分を除いた後、TMB発色基質 (MOSS社、TMBH-100) を1ウエル当たり100 $\mu$ L添加した。室温で約20分間反応させて発色させた後、1ウエル当たり100 $\mu$ Lの1規定硫酸を加えて発色を停止した。次いで波長450nmにおける吸光度を測定した。検体中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの濃度は、スタンダードの吸光度より作成した検量線から読み取った。上記のようにして構築したELISAによって、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを測定できることが確認された。

### 【0080】

#### 7. インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの投与の影響

8-10週令の雄マウスを16時間絶食後、pentobarbital麻酔し頸静脈より精製したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを100ng投与した。インスリン

レセプター $\alpha$ サブユニットは、0.1%BSAを含む50 $\mu$ Lの生理食塩水に溶解して投与した。インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット投与後のマウスから、経時的に尾静脈より採血し血糖値を測定した。対照として、0.1%BSAを含む50 $\mu$ Lの生理食塩水のみを同様にしてマウスに投与した。

### 【0081】

結果は図5に示した。対照のマウスは絶食状態が続いたため少しづつ血糖値は低下した。一方インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを血中投与したマウスでは、血糖値の経時的な上昇が観察された。これは投与したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットがインスリンと結合することにより、インスリンの作用が阻害されたと考えられる。

### 【0082】

#### 8. インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの投与の影響（グルコース負荷）

7と同じ条件でインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを投与した10分後に、腹腔内にグルコース（2g/Kg body weight）を投与した。グルコースの投与後に経時的に尾静脈より採血し血糖値を測定した。対照として、0.1%BSAを含む50 $\mu$ Lの生理食塩水のみを同様にして投与したマウスに、同量のグルコースを投与した。

### 【0083】

結果は図6に示した。インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを投与すると、グルコース負荷試験で耐糖能異常を示すことが確認された。以上の2つの結果は、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットが血中に存在すると、インスリンと結合しインスリン作用を阻害し、血糖値を上昇させ、糖尿病の増悪因子になる可能性が高いことを示す。

### 【0084】

#### 【発明の効果】

本発明は、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定方法を提供了。これまで、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの存在は確認されていなかった。またその測定方法も確立されていなかった。本発明者により、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットは、インスリンの作

用を妨げることが明らかにされた。したがって、血中の遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定は、糖尿病のリスクを明らかにするために有用である。

また本発明は、遊離のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの測定に有用な、遊離型のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットとその製造方法を提供した。本発明によって得ることができる、遊離型の $\alpha$ サブユニットは、標準試料や免疫原として利用することができる。

### 【0085】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Yousuke, EBINA

Toshiyuki, OBATA

Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.

<120> Method for determination of insulin receptor alpha subunit

<130> M3-A0301

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2859

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(81)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2859)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (82)..()

<223>

<400> 1

atg ggc acc ggg ggc cgg cgg ggg gcg gcg gcc ggc ccg ctg ctg gtg 48  
Met Gly Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val  
-25 -20 -15

gcg gtg gcc gcg ctg cta ctg ggc gcc ggc cac ctg tac ccc gga 96  
Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly  
-10 -5 -1 1 5

gag gtg tgt ccc ggc atg gat atc cgg aac aac ctc act agg ttg cat 144  
Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His  
10 15 20

gag ctg gag aat tgc tct gtc atc gaa gga cac ttg cag ata ctc ttg 192  
Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu

25	30	35
----	----	----

atg ttc aaa acg agg ccc gaa gat ttc cga gac ctc agt ttc ccc aaa	240
-----------------------------------------------------------------	-----

Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys
-----------------------------------------------------------------

40	45	50
----	----	----

ctc atc atg atc act gat tac ttg ctg ctc ttc cgg gtc tat ggg ctc	288
-----------------------------------------------------------------	-----

Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu
-----------------------------------------------------------------

55	60	65
----	----	----

gag agc ctg aag gac ctg ttc ccc aac ctc acg gtc atc cgg gga tca	336
-----------------------------------------------------------------	-----

Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser
-----------------------------------------------------------------

70	75	80	85
----	----	----	----

cga ctg ttc ttt aac tac gcg ctg gtc atc ttc gag atg gtt cac ctc	384
-----------------------------------------------------------------	-----

Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu
-----------------------------------------------------------------

90	95	100
----	----	-----

aag gaa ctc ggc ctc tac aac ctg atg aac atc acc cgg ggt tct gtc	432
-----------------------------------------------------------------	-----

Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val
-----------------------------------------------------------------

105	110	115
-----	-----	-----

cgc atc gag aag aac aat gag ctc tgt tac ttg gcc act atc gac tgg	480
-----------------------------------------------------------------	-----

Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp
-----------------------------------------------------------------

120	125	130
-----	-----	-----

tcc cgt atc ctg gat tcc gtg gag gat aat cac atc gtg ttg aac aaa	528
-----------------------------------------------------------------	-----

Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn His Ile Val Leu Asn Lys
-----------------------------------------------------------------

135	140	145
-----	-----	-----

gat gac aac gag gag tgt gga gac atc tgt ccg ggt acc gct aag ggc	576		
Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly			
150	155	160	165
aag acc aac tgc ccc gcc acc gtc atc aac ggg cag ttt gtc gaa cga	624		
Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg			
170	175	180	
tgt tgg act cat agt cac tgc cag aaa gtt tgc ccg acc atc tgt aag	672		
Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys			
185	190	195	
tca cac ggc tgc acc gcc gaa ggc ctc tgt tgc cac agc gag tgc ctg	720		
Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu			
200	205	210	
ggc aac tgt tct cag ccc gac gac ccc acc aag tgc gtg gcc tgc cgc	768		
Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg			
215	220	225	
aac ttc tac ctg gac ggc agg tgt gtg gag acc tgc ccg ccc ccg tac	816		
Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Tyr			
230	235	240	245
tac cac ttc cag gac tgg cgc tgt gtg aac ttc agc ttc tgc cag gac	864		
Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp			
250	255	260	

ctg cac cac aaa tgc aag aac tcg cgg agg cag ggc tgc cac caa tac	912		
Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr			
265	270	275	
gtc att cac aac aac aag tgc atc cct gag tgt ccc tcc ggg tac acg	960		
Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr			
280	285	290	
atg aat tcc agc aac ttg ctg tgc acc cca tgc ctg ggt ccc tgt ccc	1008		
Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro			
295	300	305	
aag gtg tgc cac ctc cta gaa ggc gag aag acc atc gac tcg gtg acg	1056		
Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr			
310	315	320	325
tct gcc cag gag ctc cga gga tgc acc gtc atc aac ggg agt ctg atc	1104		
Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile			
330	335	340	
atc aac att cga gga ggc aac aat ctg gca gct gag cta gaa gcc aac	1152		
Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn			
345	350	355	
ctc ggc ctc att gaa gaa att tca ggg tat cta aaa atc cgc cga tcc	1200		
Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser			
360	365	370	
tac gct ctg gtg tca ctt tcc ttc cgg aag tta cgt ctg att cga	1248		

Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg

375 380 385

gga gag acc ttg gaa att ggg aac tac tcc ttc tat gcc ttg gac aac 1296

Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn

390 395 400 405

cag aac cta agg cag ctc tgg gac tgg agc aaa cac aac ctc acc acc 1344

Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Thr

410 415 420

act cag ggg aaa ctc ttc cac tat aac ccc aaa ctc tgc ttg tca 1392

Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser

425 430 435

gaa atc cac aag atg gaa gaa gtt tca gga acc aag ggg cgc cag gag 1440

Glu Ile His Lys Met Glu Glu Val Ser Gly Thr Lys Gly Arg Gln Glu

440 445 450

aga aac gac att gcc ctg aag acc aat ggg gac aag gca tcc tgt gaa 1488

Arg Asn Asp Ile Ala Leu Lys Thr Asn Gly Asp Lys Ala Ser Cys Glu

455 460 465

aat gag tta ctt aaa ttt tct tac att cgg aca tct ttt gac aag atc 1536

Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile

470 475 480 485

ttg ctg aga tgg gag ccg tac tgg ccc ccc gac ttc cga gac ctc ttg 1584

Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu

490

495

500

ggg ttc atg ctg ttc tac aaa gag gcc cct tat cag aat gtg acg gag 1632  
 Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu

505

510

515

ttc gat ggg cag gat gcg tgt ggt tcc aac agt tgg acg gtg gta gac 1680  
 Phe Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Thr Val Val Asp  
 520 525 530

att gac cca ccc ctg agg tcc aac gac ccc aaa tca cag aac cac cca 1728  
 Ile Asp Pro Pro Leu Arg Ser Asn Asp Pro Lys Ser Gln Asn His Pro  
 535 540 545

ggg tgg ctg atg cgg ggt ctc aag ccc tgg acc cag tat gcc atc ttt 1776  
 Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe  
 550 555 560 565

gtg aag acc ctg gtc acc ttt tcg gat gaa cgc cgg acc tat ggg gcc 1824  
 Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala  
 570 575 580

aag agt gac atc att tat gtc cag aca gat gcc acc aac ccc tct gtg 1872  
 Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val  
 585 590 595

ccc ctg gat cca atc tca gtg tct aac tca tca tcc cag att att ctg 1920  
 Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Gln Ile Ile Leu  
 600 605 610

aag tgg aaa cca ccc tcc gac ccc aat ggc aac atc acc cac tac ctg	1968		
Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu			
615	620	625	
gtt ttc tgg gag agg cag gcg gaa gac agt gag ctg ttc gag ctg gat	2016		
Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp			
630	635	640	645
tat tgc ctc aaa ggg ctg aag ctg ccc tcg agg acc tgg tct cca cca	2064		
Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro			
650	655	660	
ttc gag tct gaa gat tct cag aag cac aac cag agt gag tat gag gat	2112		
Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp			
665	670	675	
tcg gcc ggc gaa tgc tgc tcc tgt cca aag aca gac tct cag atc ctg	2160		
Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu			
680	685	690	
aag gag ctg gag gag tcc tcg ttt agg aag acg ttt gag gat tac ctg	2208		
Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu			
695	700	705	
cac aac gtg gtt ttc gtc ccc aga aaa acc tct tca ggc act ggt gcc	2256		
His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala			
710	715	720	725

gag gac cct agg cca tct cg <sup>g</sup> aaa cgc agg tcc ctt ggc gat gtt ggg	2304		
Glu Asp Pro Arg Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ser Leu Gly Asp Val Gly			
730	735	740	
aat gtg acg gtg gcc gtg ccc acg gtg gca gct ttc ccc aac act tcc	2352		
Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser			
745	750	755	
tcg acc agc gtg ccc acg agt ccg gag gag cac agg cct ttt gag aag	2400		
Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg Pro Phe Glu Lys			
760	765	770	
gtg gtg aac aag gag tcg ctg gtc atc tcc ggc ttg cga cac ttc acg	2448		
Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg His Phe Thr			
775	780	785	
ggc tat cgc atc gag ctg cag gct tgc aac cag gac acc cct gag gaa	2496		
Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp Thr Pro Glu Glu			
790	795	800	805
cgg tgc agt gtg gca gcc tac gtc agt gcg agg acc atg cct gaa gcc	2544		
Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr Met Pro Glu Ala			
810	815	820	
aag gct gat gac att gtt ggc cct gtg acg cat gaa atc ttt gag aac	2592		
Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu Ile Phe Glu Asn			
825	830	835	
aac gtc gtc cac ttg atg tgg cag gag ccg aag gag ccc aat ggt ctg	2640		

Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu Pro Asn Gly Leu

840

845

850

atc gtg ctg tat gaa gtg agt tat cgg cga tat ggt gat gag gag ctg 2688

Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Glu Leu

855

860

865

cat ctc tgc gtc tcc cgc aag cac ttc gct ctg gaa cgg ggc tgc agg 2736

His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu Arg Gly Cys Arg

870

875

880

885

ctg cgt ggg ctg tca ccg ggg aac tac agc gtg cga atc cgg gcc acc 2784

Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg Ile Arg Ala Thr

890

895

900

tcc ctt gcg ggc aac ggc tct tgg acg gaa ccc acc tat ttc tac gtg 2832

Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr Tyr Phe Tyr Val

905

910

915

aca gac tat tta gac gtc ccg tca aat 2859

Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn

920

925

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 953

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val  
-25 -20 -15

Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly  
-10 -5 -1 1 5

Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His  
10 15 20

Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu  
25 30 35

Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys  
40 45 50

Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu  
55 60 65

Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser  
70 75 80 85

Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu  
90 95 100

Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val  
105 110 115

Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp

120

125

130

Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn His Ile Val Leu Asn Lys

135

140

145

Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly

150

155

160

165

Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg

170

175

180

Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys

185

190

195

Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu

200

205

210

Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg

215

220

225

Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Pro Tyr

230

235

240

245

Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp

250

255

260

Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr

265

270

275

Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr

280

285

290

Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro

295

300

305

Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr

310

315

320

325

Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile

330

335

340

Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn

345

350

355

Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser

360

365

370

Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg

375

380

385

Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn

390

395

400

405

Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Thr

410

415

420

Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser

425

430

435

Glu Ile His Lys Met Glu Glu Val Ser Gly Thr Lys Gly Arg Gln Glu

440 445 450

Arg Asn Asp Ile Ala Leu Lys Thr Asn Gly Asp Lys Ala Ser Cys Glu

455 460 465

Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile

470 475 480 485

Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu

490 495 500

Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu

505 510 515

Phe Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Thr Val Val Asp

520 525 530

Ile Asp Pro Pro Leu Arg Ser Asn Asp Pro Lys Ser Gln Asn His Pro

535 540 545

Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe

550 555 560 565

Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala

570 575 580

Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val

585

590

595

Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Gln Ile Ile Leu  
600 605 610

Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu  
615 620 625

Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp  
630 635 640 645

Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro  
650 655 660

Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp  
665 670 675

Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu  
680 685 690

Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu  
695 700 705

His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala  
710 715 720 725

Glu Asp Pro Arg Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ser Leu Gly Asp Val Gly  
730 735 740

Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser

745 750

755

Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg Pro Phe Glu Lys

760 765 770

Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg His Phe Thr

775 780 785

Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp Thr Pro Glu Glu

790 795 800 805

Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr Met Pro Glu Ala

810 815 820

Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu Ile Phe Glu Asn

825 830 835

Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu Pro Asn Gly Leu

840 845 850

Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Glu Leu

855 860 865

His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu Arg Gly Cys Arg

870 875 880 885

Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg Ile Arg Ala Thr

890 895 900

Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr Tyr Phe Tyr Val

905

910

915

Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn

920

925

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例においてインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットのCHO細胞における発現のために用いたcDNAによってコードされるアミノ酸配列と、インスリンレセプターの全長アミノ酸配列との関係を示す図である。

【図2】図2は、インスリンレセプター前駆蛋白質のアミノ酸配列に占める、各サブユニットのアミノ酸配列、および実施例において発現させた組み換え体のアミノ酸配列の関係を示す。図中、大文字で示したのが $\alpha$ サブユニット、 $\alpha$ サブユニットのN末端側とC末端側に小文字で示したアミノ酸配列が、それぞれシグナルペプチドと $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列である。 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中、ボックスで囲んだ部分が膜貫通領域(TM)である。図1におけるSspI切断断片によってコードされるアミノ酸配列にアンダーラインを付けて示した。

【図3】図3は、抗インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット抗体カラムによる、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの精製結果を示す写真である。抗インスリンレセプター( $\alpha$ サブユニット抗体、イムノテック0365)抗体カラムに吸着させたインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを、1.5M MgCl<sub>2</sub>含有ホウ酸ナトリウム緩衝液で溶出し、溶出液を200 $\mu$ lずつ分取した。それぞれのフラクションから20 $\mu$ Lをとり、7.5% SDS-PAGEし、銀染色した。

【図4】図4は、実施例において作製したインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットの標準曲線(standard curve)である。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸はサンプル中のインスリンレセプター $\alpha$ サブユニット濃度(ng/mL)を示す。

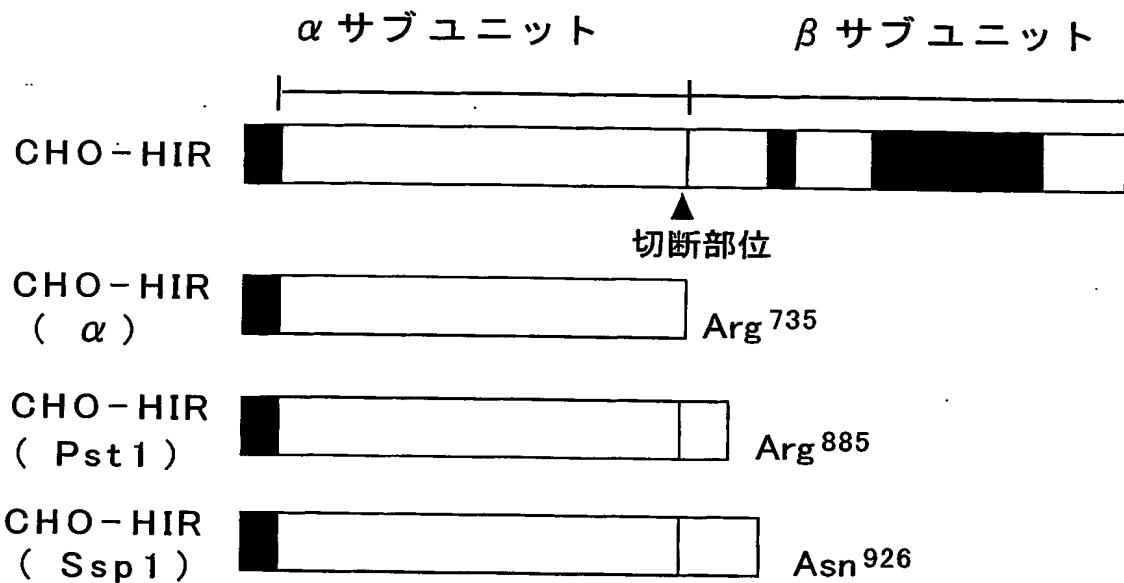
【図5】図5は、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを投与したマウスにお

ける血糖値の経時的变化を示す。図中、縦軸は血糖値(mg/mL)を、横軸はインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを投与した時間を-10とする経過時間(分)を示す。

【図6】図6は、インスリンレセプター $\alpha$ サブユニット投与の10分後に、糖負荷を与えたマウスにおける血糖値の経時的变化を示す。図中、縦軸は血糖値(mg/mL)を、横軸はインスリンレセプター $\alpha$ サブユニットを投与した時間を-10とする経過時間(分)を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】

Signal peptide

mgtggrrgaaaapilvavaalllgaaghLYPGEVCPGMDIRNNLTRLHELENCSVIEGHL  
 -27 1

QILLMFKTRPEDFRDLSFPKLIMITDYLLLFRVYGLESLKDLFPNLTVIRGSRLFFNYAL  
VIFEMVHLKELGLYNLMNITRGSVRIEKNNELCYLATIDWSRILDSVEDNHIVLNKDDNE  
ECGDICPGTAKGKTNCPATVINGQFVERCWTHSHCQKVCPTICKSHGCTAEGLCCHSECL  
GNCSQPDDPTKCVACRNFYLDGRCVETCPPYYHFQDWRCVNFSFCQDLHHKCKNSRRQG  
CHQYVIHNNKCIPECPSGYTMNSSNLLCTPCLGPCPKVCHLLEGEKTIDSVTSAQELRGC  
TVINGSLIINIRGGNNLAAELEANGLIEEISGYLKIRRSYALVSLSSFRKLRLIRGETL  
EIGNYSFYALDNQNLRQLWDWSKHNLTTCQGKLFHYNPKLCLSEIHKMEEVSGTKGRQE  
RNDIALKTNGDKASCENELLKFSYIRTSFDKILLRWEPYWPPDFRDLLGFMLFYKEAPYQ  
NVTEFDGQDACGSNSWTVVDDIDPPLRSNDPKSQNHPGWLMRGLKPWTQYAIFVKTIVTFS  
DERRTYGAKSDIIYVQTDATNPSVPLDPISVSNSSSQIILKWKPPSDPNGNITHYLVFWE  
RQAEDSELFELDYCLKGLKLPRTWSPPFESEDSQKHQNQSEYEDSAGECCSCPKTDSQIL  
KELEESSFRKTFEDYLHNVVFVPRKTSSGTGAEDPRPSRKRRs1gdvgnvtavptvaaf

736

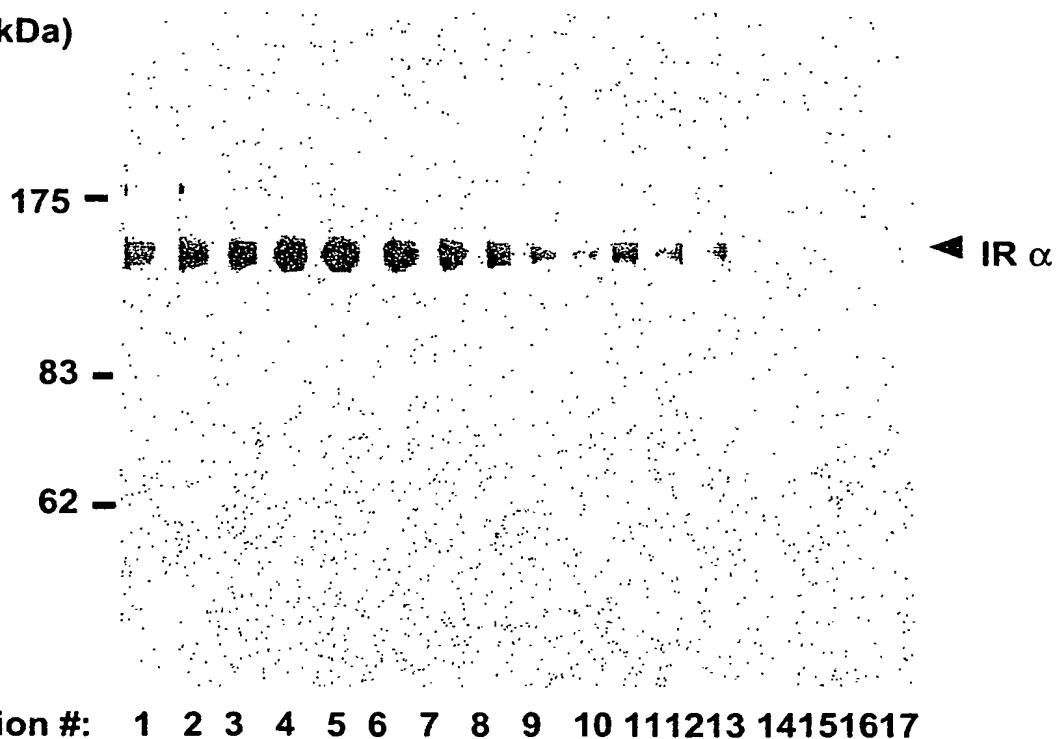
pntssts vptspeehrp fekvvnkeslvisglrhftgyrielqacnqdtpeercsvaayv  
sartmpeakaddivgpvtheifennvvhlmwqepkepenglivlyevsyrrygd eelhlc v

SspI

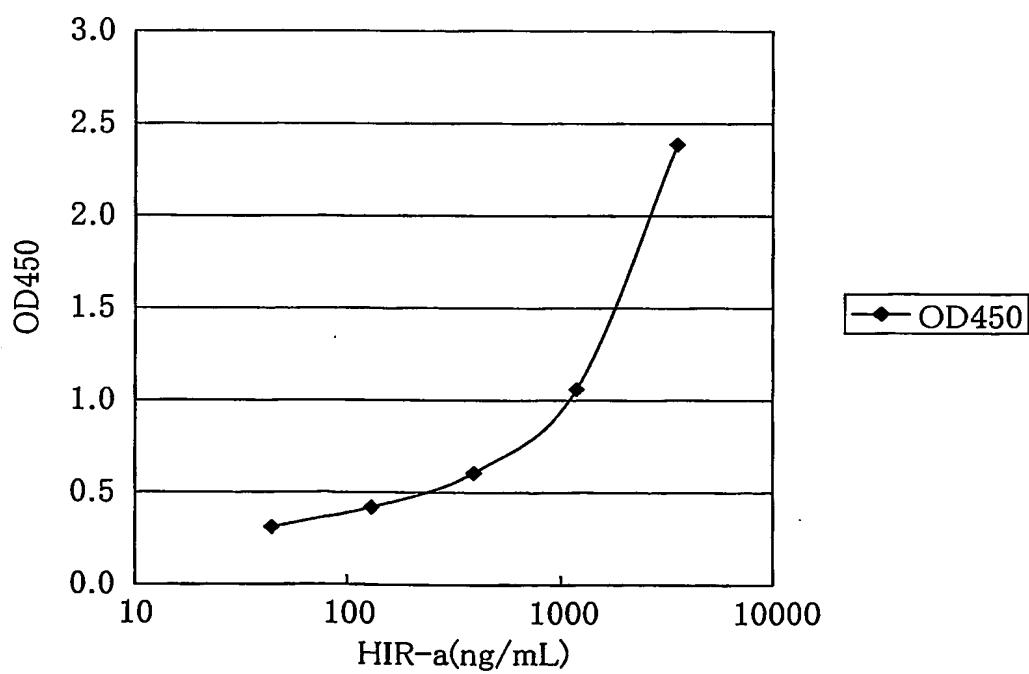
srkhfalergcrlrglspgnysvriratslagngsweptyfyvtdyldvpsniakiig  
plifvflfsvvigsiylflrkrqpdgplgplyassnpey1sasdvpfcsvyvpdewe vsr  
ekitllrelgqgsfgmvyegnardiikgeaetrvavktvnesaslrerieflneasvmkg  
ftchhvvr1lgvvskgqpt1vvvmelmahd1ksylrs1rpeaennpgrpppt1qemiqma  
aeiadgmaylnakkfvhrdlaarncmvahdftvkigdfgmtrdiyetdyrrkggkgl1pv  
rwmapes1kdgfvfttssdmwsfgvvlweitslaeqpyqglsneqv1kfvm dggy1d qpd n  
cpervtndlrmrcwqfnpkmrptfleivn1lkddlhpsfpevsffhseenkapese eleme  
fedmenvpldrsshcqreeaggrdggsslgfkrsyeehiipythmngkkngriltlprsn  
ps

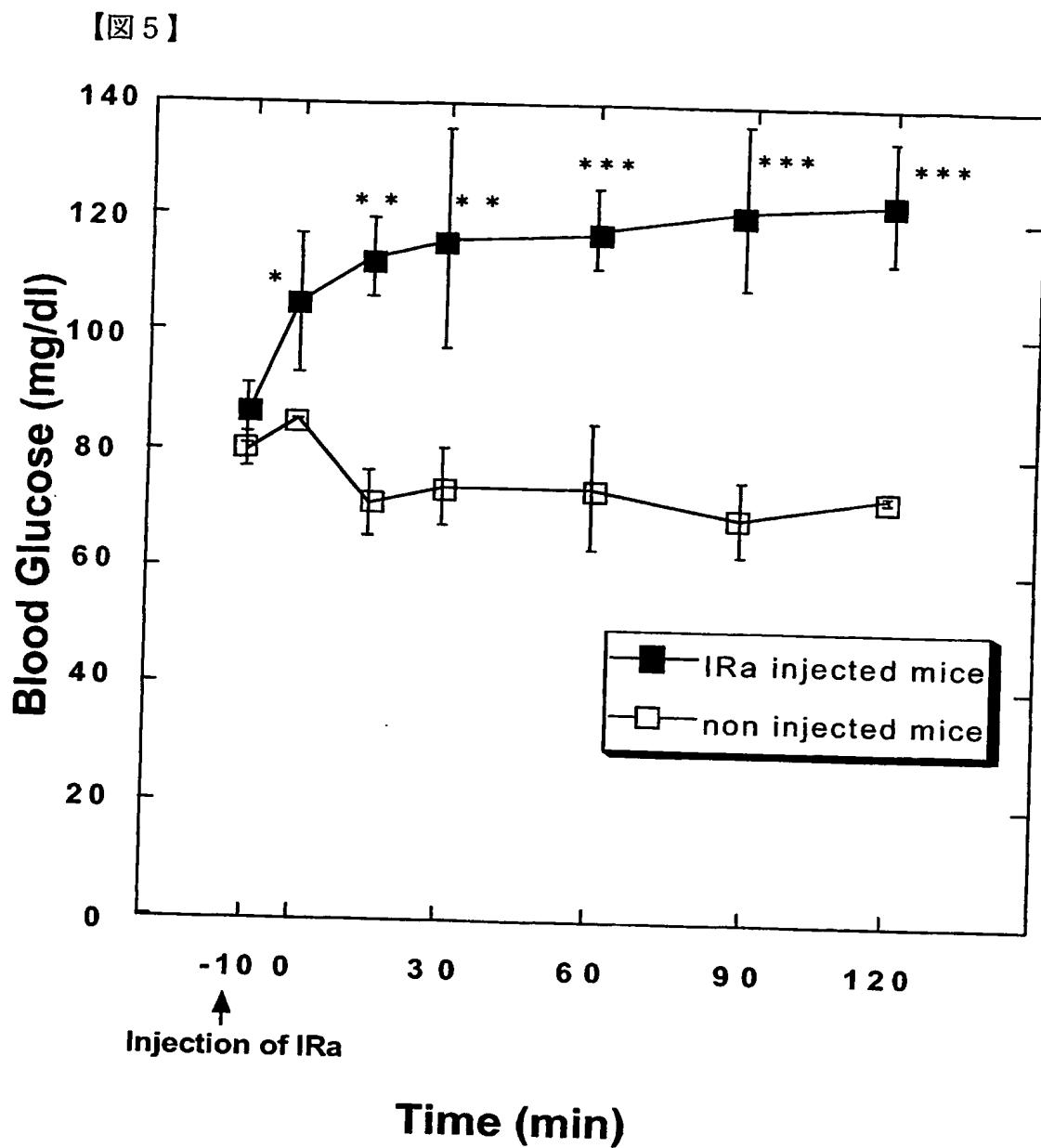
【図3】

Mw (kDa)

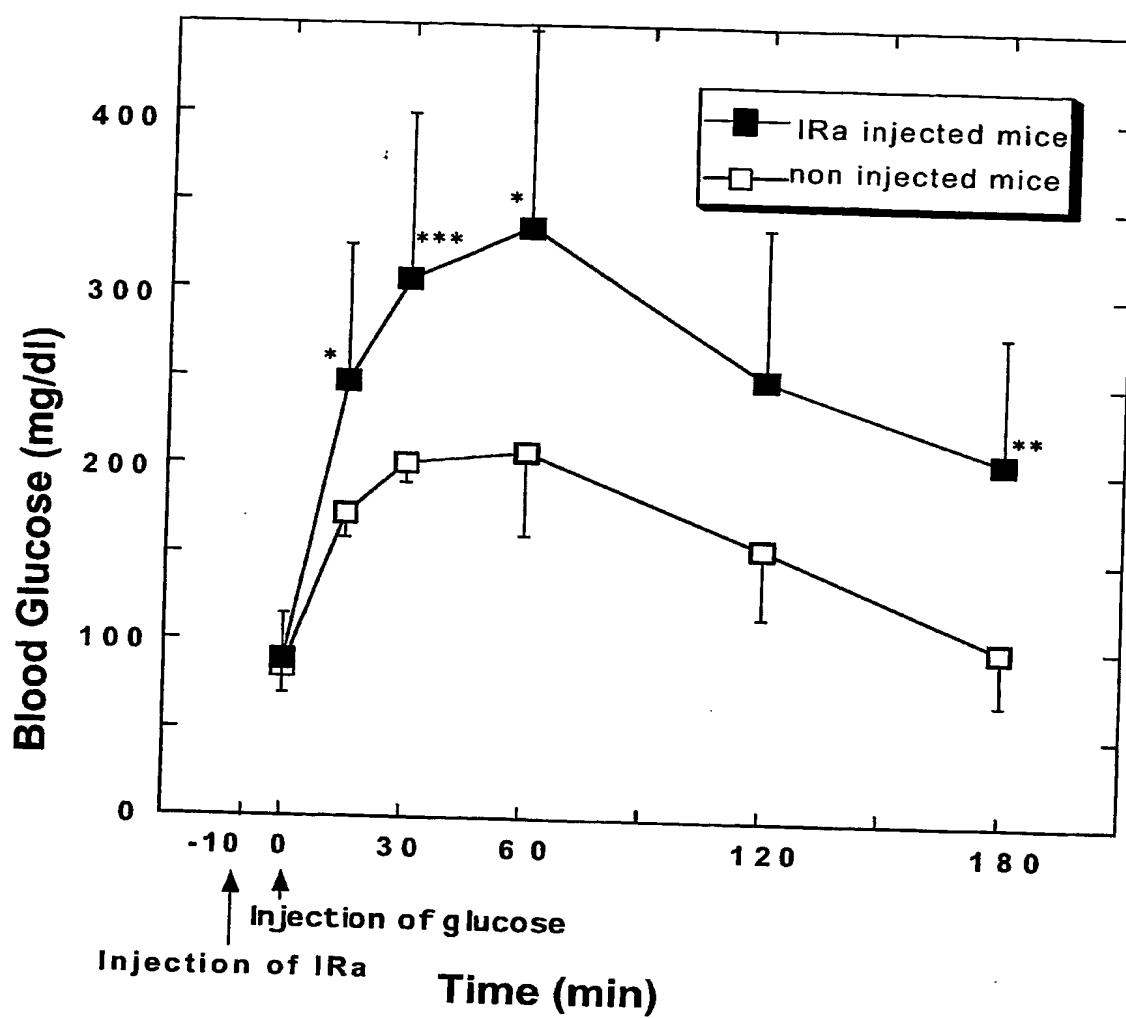


【図4】





【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

血中の遊離のインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットの測定方法の提供。

【解決手段】

血中に遊離のインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットが存在することが見出された。そして、血液試料中のインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットとインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットを認識する抗体を接触させ、両者の結合を検出する工程を含む、インスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットの測定方法が提供された。血中の遊離のインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットは、インスリンの働きを阻害し、血糖値を上昇させる。したがって、血中の遊離のインスリンレセプター  $\alpha$  サブユニットの測定方法は、糖尿病のリスクファクターの評価に有用である。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号

[594101857]

1. 変更年月日

[変更理由]

1994年 5月12日

新規登録

住所  
氏名  
徳島県徳島市八万町上福万3-48  
蛇名 洋介

## 出願人履歴情報

識別番号

[390004097]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1998年 7月22日

住所変更

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内  
ビル5F

株式会社医学生物学研究所

出願人履歴情報

識別番号

[503155289]

1. 変更年月日

[変更理由]

2003年 4月25日

新規登録

住 所

徳島県徳島市新浜町2丁目3-75-101

氏 名

小畠 利之

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**